

Mikroskopların Çalışma Mekanizması ve Çeşitleri

Zelal KARAKOÇ,¹ M. Aydın KETANİ,² Şennur KETANİ³

¹ Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Siirt

² Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Diyarbakır

³ Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Diyarbakır

Özet

Temel tıp bilimleri ve biyolojide sistem, organ ve doku fonksiyonu hakkında bugün eriştiğimiz bilgi düzeyinin temeli, fonksiyonel birim olan hücre ve yapıları hakkındaki bilgilerimiz nedeniyledir. Bu nedenle bilim insanları tarih boyunca, gözle göremedikleri bu mikro evrendeki yapıları görünür hale getirip, deneysel bilgiler toplayabilmek için farklı büyüme araçları, mikroskoplar üretme çabasında olmuşlardır.

Bileşik ilk mikroskop Janssen'in 16. yüzyılda ürettiği mikroskoptur. Ancak tarihte ilk mikroskop Hooke (1635-1703) tarafından üretilmiştir. Hooke bir boru içine yerleştiği merceği ve oküleri, bir yağ lambası (ışık kaynağı) ve su dolu küre (kondensör) yardımıyla, ince kesilmiş şişe mantarı dilimleri üzerine odaklayarak gördüğü yapıyı "hücre" olarak isimlendirmiştir. 1665 yılında Micrographia isimli kitabını yayımlamıştır. Geçmişten günümüze tüm mikroskopların arasında görüntü itibarıyla çok büyük farklar olmasına rağmen görüntülemenin temel prensibini oluşturan fizik kanunları aynıdır. Bugün laboratuvarlarda görüntüleme amacıyla en sık ışık, elektron demeti ve ultrases kullanan mikroskoplardan yararlanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çalışma prensibi, görüntü, mikroskop.

Working Mechanism and Types of Microscopes

Summary

Basic medical sciences and systems biology, today we have reached the basic level of knowledge about organ and tissue function is due to our knowledge of cell structure and functional unit. For this reason, scientists throughout history, they see eye to bring this micro-structure in the universe becomes visible, different magnification tools to collect experimental data, it has become in the effort to produce microscopes.

Janssen is the first compound microscope produced in the 16th century. But the date on the first microscope Hooke (1635-1703) was produced by. The lens puts into hooka pipe and ocular an oil lamp (light source) and water-filled sphere (condenser) with the help of the structure seen by focusing on fine-cut cork slices "cell" has been termed. In 1665 the book was released Micrographia. As in all past to the present microscope image, although very large differences in the underlying principles of the laws of physics are the same view. The most common light display purposes in laboratories today are utilized microscope uses an electron beam and ultrasound.

Key Words: image and microscope, Working prncipal,

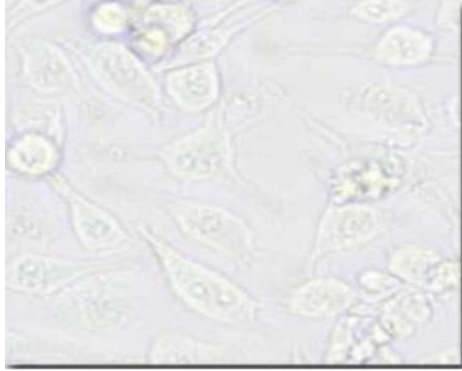
GİRİŞ

Beyaz ışık, elektromanyetik dalga spektrumun gözümüzün görebildiği 400-800 nm arasındaki kısmına karşılık gelmektedir. Görünebilir spektrumdan daha küçük dalga boyundaki ışık ışını ultraviyole, daha büyük dalga boyundaki ise infra-red spektrumunda yer alır. Farklı maksatlarla tüm bu dalga spektrumlarının seçilmiş bir bandı veya tek dalga boyuna sahip ışık ışınları kullanılmaktadır (1). Büyütmenin en bilinen aracı büyüteçtir. Burada objeden yansıyan paralel ışık ışınları lensten geçerek

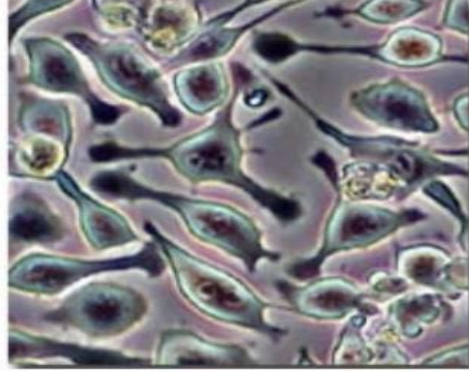
odak noktasına kırılır ve retinada görüntü oluşur. Görüntünün boyu lensin arkasında oluşan büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan büyüme gerçekleşmiş olur. Mikroskoptaki fizik prensipler özünde büyüteçtekine benzemekle birlikte bazı farklar arz eder. Mikroskopta ambient ışık yerine belli bir ışık kaynağı kullanılır. Aydınlatma ışığı bir kondensör (yoğunlaştırıcı) lens yardımıyla numuneye odaklanır. Numuneden geçen ışık ışınları (transmitted light) objektif lens tarafından birinci defa büyütülür.

Oluşan görüntü paralel ışık demetleri halinde mikroskop tüpünden okülere ulaştıktan sonra ikinci büyütme uğrar, odağa kırılan ışık demetleri gözlem planında final görüntüyü oluşturur. Oluşan görüntü aslında iki kez büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan numunenin yeterince büyük bir görüntüsünü gözlemek mümkündür. Bu yöntemle numunenin 1,000 kez büyütülmüş görüntülerini elde etmek mümkündür (1, 2, 3).

Mikroskoplarda görüntü numunenin ışığın yansıma, kırılma, transmisyon ve absorpsiyon, interferens, polarizasyon, difraksiyon ve floresansı indüklemeye özelliklerinde yararlanılarak elde edilir. Klasik ışık mikroskobu ile şiddet kontrastı, faz kontrastı, modülasyon kontrastı, interferans kontrastı yöntemleri ile örneğin farklı vasıflarını ön plana çıkartan görüntülerini elde mümkündür (4).



Işık mikroskobu



Faz-kontrast mikroskobu

- **Şekil- 1:** Canlı hücrelerin ışık mikroskobu ile faz-kontrast mikroskobu arasındaki görüntü farkı.
(www.google.com.tr/search?q=faz+kontrast+mikroskobu+görüntüleri&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj019z1vdjKAhWDCSwKHTaVBkkQ_AUIBiG#tbn=isch&q=cell+of+phase+contrast+microscopy&imgc=PrCszcqMLz3IyM%3A)

1-Yansıma

Stereomikroskop, taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi mikroskoplar; objeden yansıyan ışınları kullanarak büyütülmüş görüntü oluştururlar (4).

2-Kırılma

Işık farklı kırılma indisine sahip (farklı yoğunlukta) bir ortamdan diğerine geçerken kırılır. Işık dalgalarının iki farklı ortamda değişik hızlara sahip olmaları, ışığın doğrusal hareketinde sapmalara neden olur. Işığın kırılma özelliği merceklerin fonksiyonunda yatan bir özelliktir ve mikroskopinin her türünde kullanılır (2, 4).

3-Transmisyon-Absorpsiyon

Bir objeden geçen ışığın amplitüdünün azalması olayına absorpsiyon denir. Işık cam gibi transparanlardan geçer, buna da transmisyon denir. Bu özellikler biyolojik optik mikroskopide görüntü ve kontrast elde etmede kullanılır (4).

4-Polarizasyon

Işığın polarize olması doğal bir özelliğidir ve bu özellik mikroskopide arttırılarak kullanılır. Bir ışık demeti değişik frekanslarda dalgalar içerir ve bunlar arasında olası faz ilişkileri ve her düzlemde titreşim görülebilir. Işık dalgalarının titreşimi yalnızca bir düzlemde kısıtlanırsa buna polarize edilmiş düzlem denir (4).

5-İnterferens

Transparan objeler, içinden geçen ışığın fazını değiştirirler (yavaşlarlar). Bu faz değişikliği dalgaların girişim özelliği ile amplitüd değişikliğine dönüşebilir. Eşit amplitüdü iki ayrı dalga, eşit fazda iseler; amplitüdü orjinalin iki katı olan bir dalga oluşumu ile sonuçlanır. Ters fazlı iseler; girişim sonucu birbirini söndürür ve amplitüdü 0 olur. Bu özellik faz-kontrast mikroskopide kullanılır (2,4).

6-Difraksiyon

Işık ışınları bir engelin kenarından, köşesinden ya da bir delikten (ışığın dalga boyundan küçük veya eşit) geçerken bu engel etrafında kırılma ve dağılma özelliğine sahiptir. Işığın difraksiyon özelliği optik aletlerde çözümlene gücünü etkiler. Bu özelliğe göre mikroskoplarda kullanılan ışık kaynağının dalga boyu ve ışığın geçmesini sağlayan apertürlerin çapı yapım sırasında dikkate alınarak en iyi resolüsyona ve kontrasta ulaşılmaya çalışılır (2,4).

7-Floresansı İndüklemeye

Floresans bazı maddelerin sahip olduğu bir özelliktir. Bu maddeler belirli dalga boyundaki ışığı absorbe edip, daha uzun dalga boyunda ışık olarak tekrar yayarlar. Ultraviyole gibi görme sınırlarımız dışında kalan bir ışık floresan bir madde tarafından absorbe edilip, görülebilen ışık spektrumu içinde bir dalga boyunda yansıtıldığında, görülebilir (2,4).

MİKROSKOP ÇEŞİTLERİ

1-Stereomikroskop

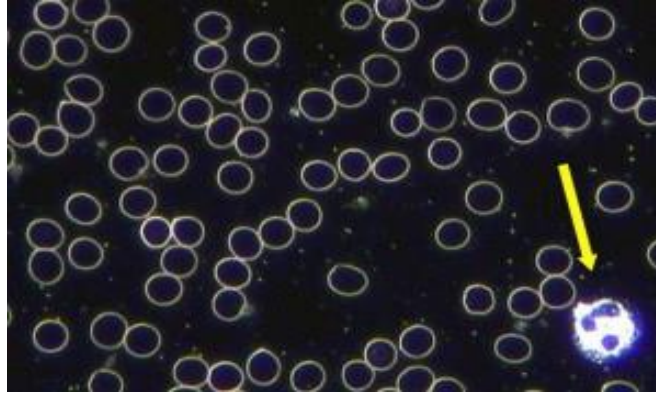
Sadece yüzey özelliklerini incelemeye kullanılır. Özellikle kriminal laboratuvarlarında, İn vitro fertilizasyon uygulamalarında, Preparat hazırlık aşamasında dokuların küçültülmesinde kullanılır (4).

2-Aydınlık Alan Mikroskobu

Işık mikroskobunun klasik görüntüleme tekniğidir. Preparat kondansör tarafından üretilen ve alttan gelen ışık demeti ile aydınlatılır. Kontrasttan zengin preparatlar bu teknikle iyi sonuç verebilir (3,4).

3-Karanlık Alan Mikroskobu

Ayna kondansörler kullanılır. Örneğe gelen merkez ışınlar engellenirken yalnızca oblik gelen ışınlar yansıtılır. Böylece örneğin sadece parlak olan kenarları izlenir. Hücre süspansiyonlarında hücrelerin (bakteri, protozoa) görüntülenmesinde, hücre kültürlerinde hareketlilik tespitinde, Otoradyografi uygulanmış preparatların incelenmesinde (İN situ hibridizasyon), sıvılarda içerik incelenmesinde ve genellikle boyanmamış örneklerin görüntülenmesinde kullanılır (4).



■ Şekil-2: Ok: Alyuvarların Karanlık Alan Mikroskobundaki Görünümü.

(<http://microscopegenius.com/microscope-basics/compound-microscopes/darkfield-microscopes/>)

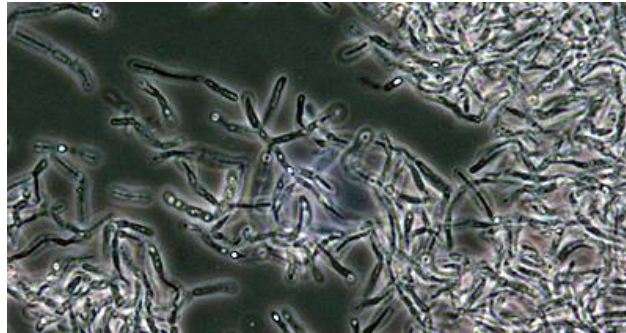
4-Faz-Kontrast Mikroskobu

Işığın farklı kırılma indisine sahip hücre ve hücre dışı yapılardan geçerken hızını ve yönünü değiştirmesine (faz-kontrast farklılığı yaratılmasına) dayanır. Faz-kontrast mikroskobunda görüntü iki türdür (4).

4.1-Pozitif (karanlık) faz-kontrast; örnek detayı, aydınlık geri plan üzerinde koyu yapılar olarak izlenir.

4.2-Negatif (aydınlık) faz-kontrast; örnek detayı, karanlık geri plan üzerinde parlak yapılar olarak izlenir.

Faz kontrast mikroskobu genellikle boyanmamış canlı hücrelerin incelenmesi, hücre içi yapıların incelenmesi, yüksek büyütmelerde detay incelemesi ve silia, filagellum gibi membran farklılıklarının incelenmesinde kullanılır.



■ Şekil-3: Bacillus anthracis sporlarının faz kontrast mikroskobu altındaki görünümü.

(<http://www.mayo.edu/research/centers-programs/translational-immunovirology-biodefense-program/overview>)

5-Diffarensiyel İnterferans Kontrast Mikroskopisi (DIC)

Nomarski tarafından 1950'li yıllarda tanımlanan, örnekteki değişik optik gradyanları belirleme ve bunları değişik ışık yoğunluklarına çevirebilme yöntemini kullanır. Yapıların kimyasal ajanlar (boyalar) yerine optik özellik kullanılarak görülür hale getirilmesi söz konusudur. Gelen ışık kondansörün altındaki bir polarizörden geçirilerek tüm ışın demetlerinin polarize olması sağlanır. Buradan çıkan demetler bir prizmadan (Wollaston prizması) geçirilmek suretiyle iki farklı ışın demeti şekline dönüştürülür. Bu demetler birbirine yakın olarak ilerlerler. Örnekteki farklı yapılar tarafından hızının yavaşlaması ya da refraksiyonu nedeniyle bu iki ışın demetinin ilerlemede farklılıklar ortaya çıkar. Objektife gelen ışınlar ikinci bir prizma ve onu takiben analizörden geçerek göze ulaşır (4).

7-Floresan Mikroskopu

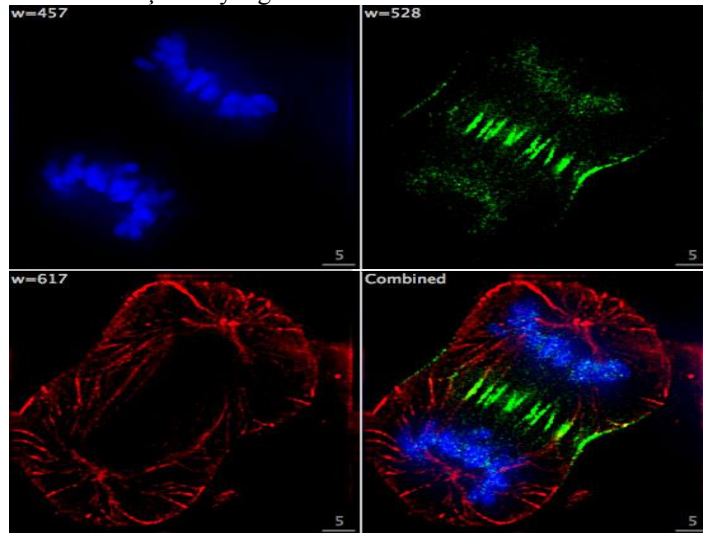
Belli floresan maddeler uygun (kısa) dalga boyundaki ışık altında tutulduğunda daha uzun dalga boyundaki ışık yayarlar. Floresan mikroskopta doku kesitleri morötesi (ultraviyole 360 nm, mavi ışık 400 nm) ışık altında tutulur. Civa buharlı lambalar, ksenon gaz lambaları kullanılır. Floresan maddeler karanlık bir zemin üzerinde parlak ışıklı parçacıklar şeklinde izlenir. Floresan mikroskoplarda, arzu edilen dalga boyundaki yansımanın görüntülenebilmesi için, bazı filtreler kullanılır. Işık kaynağının

6-Polarizasyon (Kutuplaştırma) Mikroskopu

Polarizasyon mikroskopu incelenen cisimlerin optik anizotropik özelliğinden yararlanarak görüntülenmesi için kullanılır. Yapıların sahip olduğu çift kırılma özelliğinden yararlanır. Kutuplaştırıcı bir filtreden geçen normal ışık sadece bir yönde titreterek çıkar. Bu filtrenin üzerine ikinci bir filtre, ana eksenini ikinci filtreye dik olacak biçimde yerleştirilir ve böylece karanlık alan etkisi oluşur. Polarize edici iki filtre arasına belirli bir yöne doğru yönelmiş molekül içeren doku yapıları yerleştirilirse belli düzende yinelenen yapılar polarizörden çıkan ışığın eksenini saptırırlar. Sonuçta koyu zemin üzerinde bu yapılar parlak görünür (4).

önünde objeye ulaşacak dalga boyunu seçen bir filtre, objektiften sonra kısa dalga boyunun göze ulaşmasını önleyen bir filtre yerleştirilmiştir (5).

Moleküler düzeyde hücre ve doku içeriğinin belirlenmesi (örnek Akridin turuncusu ile boyanmış preparatlarda DNA ve RNA'nın hücre içi konumu), maddelerin hücre/dokulardaki yoğunluğunun belirlenmesi, ışık mikroskopik boyama yöntemleriyle ayırt edilemeyen hücreler ve hücre içi/dışı elemanların gösterilmesinde kullanılır (4).



■ Şekil-4: Hücre bölünmesi sırasında DNA mavi, proteinler yeşil, mikrotubullerin kırmızı olarak görüldüğü floresan mikroskop görüntüsü

(https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope)

Konfokal Mikroskopu

Konfokal mikroskopi hücre araştırmaları için ideal bir araştırma yöntemidir. Ancak doku parçalarında kullanımı nispeten kısıtlıdır. Uyarı ışığının derindeki hücreye penetrasyonu ve floresan emisyonunun dokuda yayılımı zor olduğundan yüksek enerji kullanılması gerekir. Yüksek enerji doku ve hücreye zarar vereceğinden canlı yapılarda uygun değildir (1, 6).

Lazer ışını örnek üzerine düşürülür. Odak planındaki yapıdan (örnekten) emisyon yayılır. Emisyon ışın dikroik aynadan yansır ve pin-hole'den geçer. PMT (foton çarpıcı)'lar tarafından sayılır. Voltaj sinyali olarak saklanır ve dijital ortamda kaydedilir. Görme alanı piksellere ayrılır, her piksel sırayla lazerle taranır. Konfokal mikroskopunda Soğurma Geçişinin (Pin-Hole) önemli bir yeri vardır. Görüntü düzlemi önüne konan pin-hole filtre görevi görür ve odak dışı yansıyan ışığın geçmesine izin vermez. Odak alanı içindeki ışık geçirildiğinden bu sayede sadece görmek istediğimiz alan netleşir (4).

Canlı hücre görüntüleme, GFP (yeşil floresan protein) kullanılarak hücre ve doku içi protein tarifiğini görüntüleme, floroformlarla işaretlenebilen protein, gen gibi yapıları ve onların hareket ve pozisyonlarını görüntüleme, Hibridizasyon ve floresan PCR'in de kullanıldığı kromozom üzerindeki gen lokalizasyonunu saptamada, Subselüler fonksiyonu analiz etmede kullanılan mikroskop türüdür (4, 6).

9-Elektron Mikroskopu

Elektron mikroskopu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur (7).

Elektron mikroskopu yüksek çözümleme gücü ile incelemeye olanak veren bir görüntüleme sistemidir.

- İnsan gözünün ayırt etme gücü **0.1 mm**
- Işık mikroskopunun ayırt etme gücü **0.2 µm**
- Elektron Mikroskopunun ayırt etme gücü **0.1 nm**'dir.

EM'nun, Transmission Electron Microscopy (TEM) ve Scanning Electron Microscopy (SEM) olmak üzere iki temel tipi vardır. Daha az kullanım alanına sahip Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)'da üçüncü tipi olarak bilinmektedir (3, 7, 8).

9.1-Transmisyon Elektron Mikroskopu

Bu mikroskop türünde kullanılan elektronlar vakum ortamında metal bir flamanın

yüksek derecede ısıtılmasıyla elde edilir. Elektronlar salıverildikten sonra anot ile katot arasında gerilime sokulur ve böylece ivme kazanarak hızlanırlar. Anodun merkezindeki açıklıktan geçip tüpün içerisine girerek kesintisiz bir elektron demeti oluştururlar. Bu demet elektrik bobinleri (elektro manyetik mercek) tarafından saptırılır. Bazı elektronlar kesitteki atomlarla etkileşime girerek yoluna devam ederken, diğerleri etkileşimsiz örnekten geçmektedir. Elektronların büyük bölümü objektife ulaşır. Görüntü son aşamada floresan bir ekrana ya da fotoğraf plakalarına veya elektronik kameraya düşürülür. Elde edilen görüntü siyah beyazdır. Görüntüdeki koyu alanları elektron yoğun, açık renkli alanlar ise elektron geçirgen olarak adlandırılır (4,7).

9.2-Tarama Elektron Mikroskopu

Bu mikroskop, örnek üzerinde bir noktadan sırayla hareket ettirilen çok ince bir elektron demeti oluşturur. Elektronlar örnekten geçmez, daha önceden doku üzerine kaplanan ince bir metal tabaka üzerine çarpar ve yansır. Bu elektronlar bir algılayıcı tarafından yakalanarak yükselticilere gönderilir ve oluşan sinyallerde monitöre aktarılır (4, 7).

Hücre içi organellerin yapıları, organellerin hücre içindeki dağılımı, organellerin diğer organeller ile komşuluğu, organellerin fonksiyonel ilişkileri, çekirdeğin yapısı, membran bütünlüğü, membrandaki değişiklikleri, dokuların organizasyonunun ortaya konmasında kullanılır. Bunların dışında; patolojik durumların tespitinde de kullanım olanağı bulunmaktadır. Şöyle ki;

Renal biyopsilerin değerlendirilmesi: Glomerüler bozukluklar, bazal membran kalınlaşmaları, mezangial değişiklikler, immün kompleks birikimleri,

Doğru tümör tanısı: Tümörlerin tiplendirilmesi ve evrelendirilmesi, metatazelerde primer odağın belirlenmesi, çeşitli nöroendokrin tümörlerin tanınması, lenfomalar,

Doğumsal bazı metabolizma bozukluklarının tanınması: Glikojen depo hastalıkları, mukopolisakkaridozlar, lipidozlar, ailesel depo hastalıkları,

Virus gibi enfeksiyon ajanlarının dokularda tanınması: herpes simpleks, legionella pneumophila, Whipple hastalığı, Bazı deri hastalıkları: Büllöz dermatitler, kutanöz amiloid, viral deri lezyonları, saç telinin SEM incelemesi, histiositozis X, v.b.

Ca, Mg, Na, Zn ve K gibi hücre içi iyon konsantrasyonu değişimlerini ölçmede kullanılır.



■ **Şekil-5:** Schwann hücresi (Maymun) elektron mikroskop görüntüsü.
(www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMKernE.html)

Kaynaklar

- 1-Pural N. (2004). Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. Hacettepe Tıp Dergisi 35:107-113.
- 2- Doğan E ve Çetin M. Mikroskopik Görüntüler için İçkin Görüntü Hesaplaması ve Görüntü Bulanıklığının Giderilmesi. Erişim: www.researchgate.net/publications. Erişim tarihi: 04.10.2014.
- 3- İşçi C. (2008). Cisimleri nasıl ve ne kadar ayrıntılı görebiliriz? Resim ve görmede çözünürlük. Journal of Yasar University, 3(11), 467-477. London.

- 4- Junquera LC ve Carneiro J. (2006). Temel Histoloji. 2. Basım. Nobel Yayınevi, Ankara.
- 5- Herman B. (1998). Fluorescence microscopy. 2th Edition. New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- 6- Paddock S. (1998). Confocal microscopy .Methods in molecular biology Volume 122. Humana Press.
- 7-Kapakin K. (2007). Transmission Elektron Mikroskobu. Yü Vet Fak Derg.18(1):105-110.
- 8- Bozzola JJ and Russell LD. (1998). Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist. 2th Edition.

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr.Zelal KARAKOÇ

Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Merkez Kampüs 56100 SİİRT
Faks: 0 484 223 86 78
e-mail:zelalkarakoc@siirt.edu.tr